



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Efecto tóxico de cobre y mercurio sobre el crecimiento poblacional de *Lecane quadridentata* (Ehrenberg, 1832)  
(Rotifera: Lecanidae)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A**

Frida Irais Corral Jácquez

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. SINGARAJU SRI SUBRAHMANYA SARMA

Los Reyes Iztacala a 17 de Abril del 2009





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

Este trabajo, con todo el esfuerzo y dedicación que significa, se lo dedico a mis padres Ma. Gregoria Jácquez Ríos y Alfredo Corral Aguirre, por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios, además de apoyarme y confiar en mí en todo momento. También le agradezco infinitamente a mis hermanos: Aesly, Fello, July y Paty porque siempre estuvieron conmigo y me dieron ánimos para seguir adelante. ¡Los Amo Familia!

A mis tíos y tías que me cuidaron y orientaron, especialmente a Magos, Alba, Paty y María; a mis primos Albita, Axel, Agni, Mario, David, Güero, Lore y pequeñines por alegrarse y divertirse conmigo, ¡Gracias!

Agradezco a mis amigos y amigas de Tizapán el Alto por sus palabras de aliento y amistad - que perdura a través de la distancia y el tiempo- han sido un pilar importante en mi vida: Vero, Lucía, Iliana, Karla, Marleny, Gera, Beto y Bernal.

Por supuesto gracias a mis compañeros y amigos de la FES-I, con quienes he compartido grandes momentos de tristeza y alegría; sin olvidar todo lo que aprendí a su lado: Ricardo, Alfredo, Chihiro, Violeta, Sandra, Hanna, Magda, Gerry, Yess, Palomy, Jair, Karen, David, Paul, Agustín, Jul, Gabriel, Carlitos, Iván, "Las Conejas", Mary, Víctor, Leo, Ale, Lupita, Rodrigo, Michel y demás personas que me brindaron su cariño y confianza estos cuatro años.

En especial quiero compartir mi gratitud y logro con Paulina, Pamela y Almita, por ser incondicionales y tan especiales en mi vida. ¡Gracias Beautiful Cheese!

Gracias a los compañeros del "Lab": Diego, Rocío, Cristian, Abraham, Gerardo, Jorge, Carmen, Jonathan y Jesús, porque siempre me ayudaron y brindaron su amistad.

Especiales gracias a mis profesores por transmitirme parte de su experiencia y alentarme a continuar paso a paso, pero principalmente por su amistad y confianza. Aquí es donde agradezco a la Maestra Teresa, Dr. Lugo y Dra. Rosario por sus atinadas observaciones y sugerencias para este trabajo.

Muchas gracias al Dr. Sarma y Dra. Nandini quienes me brindaron significantes enseñanzas que me hicieron crecer en todos los sentidos; además de que me apoyaron y ayudaron incondicionalmente y en todo momento.

Por último, pero no menos importante, agradezco a Dios por permitirme disfrutar este momento tan gratificante en compañía de mis seres queridos y bajo la protección y guía de mis angelitos amados: Angelina, Ariel, Delfina y Ubaldo.

## Del libro de los días

Los sueños son espumas de la mar  
Y hay que poner la capa como el viento venga.  
El talento trabaja, el genio crea;  
No vuelvas nunca al sitio de tus viejas alegrías.  
La concordia alimenta, la discordia nos consume;  
Ningún hombre es mejor que su conversación,  
Una respuesta suave es la cura para la cólera,  
Nunca respondas la pregunta que no te hayan hecho.  
Si el ánimo se inclina son los pies los que resbalan,  
Cuenta tus penas a ti mismo, tus alegrías al mundo;  
Pon las cosas en su sitio que ellas te darán el tuyo.  
Depende en mucho la felicidad del movimiento,  
Estudia el poder del silencio.  
Corona de la buena voluntad es la humildad,  
La herida que es causada por la lengua es incurable;  
Siempre el mejor negocio es terminar contento y  
Verdad que hiere es mejor que mentira que te aleja.  
Una palabra dicha a su debido tiempo,  
Es como una manzana de oro en charola de plata.  
Un abrazo al encuentro es mejor que al despedirse  
Y nunca es tan pequeño el vicio en el que se reincide.  
Se empieza en la salida antes de entrar y,  
¿Cuánto de ser feliz consiste en dar?  
Si desgraciadamente tienes que mendigar  
Llama sólo a las puertas de las grandes casas;  
Cuando las armas están listas el buen sentido falta,  
El mejor compañero de la adversidad... es un libro.  
El final es principio en mi canción,  
Los rumores son mentiras a medias  
Y la lengua del sabio está en su corazón  
Y el corazón del tonto está en su lengua.  
No sé si siempre pasa esto que canto  
Yo lo aprendo en mi libro de los días,  
En éste me derrumbo y me levanto;  
Para saberlo, aún quedará la vida.

Fernando Delgadillo  
*Campo de Sueños*

## INDICE

	Página
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
2.1. Metales Pesados.....	4
2.1.1. Cobre.....	4
2.1.2. Mercurio.....	4
2.2. Rotíferos.....	6
2.2.1. Características.....	6
2.2.2. Importancia.....	7
2.2.3. <i>Lecane quadridentata</i> .....	9
2.2.4. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	10
2.3. Pruebas de Toxicidad.....	11
III. Antecedentes.....	13
IV. Justificación.....	16
V. Hipótesis.....	17
VI. Objetivo General.....	17
6.1. Objetivos Particulares.....	17
VII. Materiales y Métodos.....	18
7.1. Obtención de organismos.....	18
7.2. Obtención de alimento.....	18
7.3. Preparación de los tóxicos.....	19
7.4. Diseño Experimental.....	19
VIII. Resultados.....	22

8.1. Cobre.....	22
8.2. Mercurio.....	27
IX. Análisis y Discusión.....	32
X. Conclusiones.....	41
XI. Literatura Citada.....	42
XII. Anexo.....	49

## I. RESUMEN

Se cuantificaron las respuestas poblacionales de *Lecane quadridentata* expuesto a cinco diferentes concentraciones de Cu (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 y 5.0  $\mu\text{g/L}$  como  $\text{CuSO}_4$ ) y Hg (0.0844, 0.1688, 0.3375, 0.675 y 1.35  $\mu\text{g/L}$  como  $\text{HgCl}_2$ ) a una temperatura de 23°C y una densidad de alimento de  $1 \times 10^6$  céls/ml del alga verde *Chlorella vulgaris*, durante 24 días. Se calculó la abundancia máxima y la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) por día en los controles y los tratamientos con metales pesados. En general, el crecimiento poblacional de *L. quadridentata* disminuyó al incrementar las concentraciones de Cu o Hg en el medio. El crecimiento fue similar en los controles y en la menor concentración de Cu (0.3125  $\mu\text{g/L}$ ), mientras que en los tratamientos de Hg -incluso en la más baja concentración (0.0844  $\mu\text{g/L}$ )- hubo una drástica reducción de la densidad poblacional. La abundancia máxima en el grupo control fue de  $63 \pm 5$  ind./ml, mientras que los tratamientos con metales tuvieron de 1 a 58 ind./ml dependiendo de la concentración. La tasa de crecimiento poblacional también disminuyó al aumentar las concentraciones de Cu y Hg. En general, la  $r$  disminuyó al aumentar la concentración de los metales pesados en el medio variando de  $+0.23 \pm 0.01$  a  $-0.12 \pm 0.02$ , en el caso del cobre, y de  $+0.23 \pm 0.01$  a  $0.12 \pm 0.02$  para el mercurio. Las diferencias en las respuestas poblacionales de *L. quadridentata* fueron interpretadas en términos de la toxicidad relativa de los metales pesados elegidos. Nuestro estudio mostró que la abundancia máxima fue sensible al estrés de los metales, lo que sugiere el uso de esta variable, junto con la tasa de incremento poblacional en evaluaciones ecotoxicológicas.



## II. INTRODUCCIÓN

Los problemas ambientales tienen su origen en la Revolución Industrial cuando en todos los países, incluyendo a México, el desarrollo de la industria, la urbanización, deforestación y rápido crecimiento de las poblaciones trajo como consecuencia un aumento en el consumo de productos agrícolas e industriales, incrementando así la contaminación de los ecosistemas. Esto convirtió en una de las grandes preocupaciones ecológicas actuales, al impacto ambiental causado por la liberación antropogénica de metales pesados en los diversos ambientes naturales y principalmente aquellos de mayor interacción con poblaciones humanas (De Jesús *et al.*, 2004). Se calcula que la contaminación mundial por metales pesados excede a la contaminación combinada por desechos reactivos y orgánicos; detectándose valores tóxicos de metales pesados en cercanías de sitios de desperdicio municipal e industrial y en diversos tipos de suelo, incluyendo los agrícolas (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007).

Los metales pesados se encuentran de forma natural en la corteza terrestre y se llaman así por ser elementos cuya densidad es mayor a  $5 \text{ g ml}^{-1}$ ; aunque la connotación se emplea para aquellos que son tóxicos y que en realidad abarcan los grupos de transición y postransición (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) en la tabla periódica, al igual que el de los metaloides (As y Se) (Ramírez-Pérez, 2005). Una forma opcional de nombrar a este grupo es como “elementos tóxicos”, los cuales, de acuerdo a la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), incluyen a los siguientes elementos: As, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Hg, Ti, Se y Pb (INE, 2008).

Así, para llevar a cabo sus funciones metabólicas, los organismos requieren de diversos iones inorgánicos como son el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, existen en el ambiente otros iones ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ) sin alguna actividad biológica asociada, o bien son esenciales pero tóxicos cuando se encuentran en concentraciones relativamente elevadas ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ). En la mayoría de los organismos es extremadamente tóxica la exposición a un exceso ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de metales

pesados como Cd, Hg, Cr, Ni y Pb (Langston *et al.*, 1998) ya que la mayoría tiene una gran afinidad por los átomos de sulfuro enzimáticos y habilidad para formar uniones con grupos aminos y carboxílicos de proteínas que inhiben las funciones biológicas. Algunos obstaculizan el proceso de transporte a través de la pared celular mediante los mismos sistemas de captación que utilizan los iones metálicos fisiológicamente importantes como el Ca, Mg, Cu y Zn. (Salomons *et al.*, 1995; Fraile *et al.*, 2005).

Para la sobrevivencia es primordial mantener un balance apropiado de los nutrientes esenciales y los iones inorgánicos tóxicos no fundamentales (Ramírez-Pérez, 2005); por lo que los microorganismos han desarrollado estrategias como la resistencia celular para tolerar los iones metálicos y puede ocurrir a través de varios mecanismos: 1) Obstaculización de la pared celular 2) Baja permeabilidad de la membrana plasmática 3) Extrusión activa 4) Biotransformación 5) Compartimentalización de los metales pesados dentro de vacuolas u otros organelos intracelulares; y formar complejos con agentes quelantes como 6) la unión del metal a proteínas (metalotioneínas y fitoquelatinas) o 7) compuestos no proteicos, tales como malato, citrato y polifosfatos (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007).

## 2.1. METALES PESADOS

### 2.1.1. COBRE

Elemento químico de símbolo Cu, con número atómico 29. Es un metal de transición de color rojizo y brillo metálico. Debido a su alta conductividad eléctrica, ductilidad y maleabilidad, la producción de cobre se destina a la fabricación de cables eléctricos y otros componentes electrónicos, calderas, utensilios de cocina y cañerías. Los compuestos solubles de cobre pasan al ambiente después de liberarse a través de aplicaciones en la agricultura y de emplearse como alguicida; se considera un contaminante común de la industria minera, petroquímica y de pintura lo que le permite alcanzar cuerpos de agua distantes a través del tiempo (Salomons *et al.*, 1995; Gama-Flores y *et al.*, 2009). Para la mayoría de los organismos vivos, el Cu es un micronutriente esencial ya que constituye muchas metaloenzimas y proteínas implicadas en los procesos de transporte de electrones y otras reacciones de óxido-reducción. Los organismos acuáticos generalmente satisfacen sus requerimientos de cobre con los niveles disponibles de manera natural (Harrison, 1998), pero cuando éste se encuentra en su forma iónica libre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en altas concentraciones resulta altamente tóxico. Esto se atribuye principalmente a sus interacciones con los ácidos nucleicos, a la alteración de sitios activos de enzimas y a la oxidación de componentes de membranas (Cervantes *et al.*, 1999).

### 2.1.2. MERCURIO

Elemento químico con número atómico 80 y peso atómico 200.59, el mercurio es un líquido blanco plateado a temperatura ambiente. Es un metal noble, soluble únicamente en soluciones oxidantes; se encuentra comúnmente como su sulfuro HgS, siendo un mineral menos común el cloruro de mercurio. El mercurio metálico se usa en la fabricación de termómetros, barómetros, tacómetros, termostatos y amalgamas de plata para empastes de dientes. Sin embargo, las primeras fuentes de mercurio son las

industrias mineras (extracción de oro), fabricación de equipo eléctrico, industria del papel y celulosa, fungicidas mercuriales y fabricación de cloro-sosa (Cervantes *et al.*, 1999). Dentro de la célula, el mercurio puede unirse a varios sistemas enzimáticos, microsomas y mitocondrias, produciendo lesiones celulares específicas y eventualmente muerte celular. Además, une los grupos sulfhidrilos de las proteínas alterando su conformación y actividad provocando una reducción enzimática. El mercurio también puede aumentar la permeabilidad de la membrana incrementando la concentración de iones de sodio ( $\text{Na}^{2+}$ ) y expulsando los iones de potasio, ocasionando un desequilibrio electrolítico e inflamación de la membrana (Hernández-Flores y Rico-Martínez, 2006). Este metal es uno de los pocos que pueden ser acumulados en los organismos provocando biomagnificación y, por si fuera poco, el mercurio es fácilmente transformado de los compuestos inorgánicos menos tóxicos a los compuestos orgánicos más tóxicos en los organismos (Newman *et al.*, 2007).

## 2.2. ROTÍFEROS

### 2.2.1. CARACTERÍSTICAS

El phylum Rotifera es un grupo de invertebrados microscópicos pseudocelomados con simetría bilateral, con tamaño entre 45  $\mu\text{m}$  y 2000  $\mu\text{m}$ , siendo la longitud más común de 100 a 250  $\mu\text{m}$  (Margalef, 1983). Existen alrededor de 2000 especies, de las cuales aproximadamente 500 taxa son de la clase Bdelloidea y 1500 pertenecen a la clase Monogononta (Flores-Burgos *et al.*, 2003). Para México se reportan alrededor de 283 especies (Sarma, 1999). Los rotíferos se encuentran distribuidos de forma amplia en ambientes dulceacuícolas, con densidades aproximadas a 1000 individuos  $\text{L}^{-1}$ . En general son de vida libre -herbívoros o depredadores incluso de otros rotíferos- y regularmente solitarios (Wallace y Snell, 1991; Conde-Porcuna *et al.*, 2004).

El cuerpo de los rotíferos es cilíndrico y poseen simetría bilateral, los caracteriza una cabeza apical ciliada llamada corona formada por dos ruedas rotatorias de cilios (*trochus* y *cingulum*) usadas en la locomoción y alimentación, cuentan con una faringe muscular, un mástax y un complejo paquete de mandíbulas rígidas hechas de quitina llamado trophi (Wallace & Snell, 1991). La epidermis contiene una capa densamente empaquetada de proteínas similar a la queratina denominada lórica; en su parte posterior cuentan con un pie, que puede tener de 1 a 4 dedos (Elías-Gutiérrez y Sarma, 1998).

La mayoría de las especies de rotíferos tienen una combinación de reproducción sexual y asexual llamada partenogénesis cíclica. El ciclo reproductivo asexual consiste en hembras amícticas que producen prole amíctica. Una desviación de este modo de reproducción es una señal química producida por los mismos rotíferos (*mixis signal*); ésta provoca que una fracción de las crías de hembras amícticas, sean hembras mícticas. Las hembras mícticas pueden ser fertilizadas hasta que alcanzan cierta edad. Las hembras mícticas infertilizadas producen descendientes machos, los que a su vez pueden aparearse con ellas y fertilizar a otras hembras mícticas. Las hembras mícticas fertilizadas producen

huevos de resistencia, los cuales, después de un determinado tiempo de letargo por factores ambientales, eclosionan como hembras amícticas (Alver y Hagiwara, 2007)

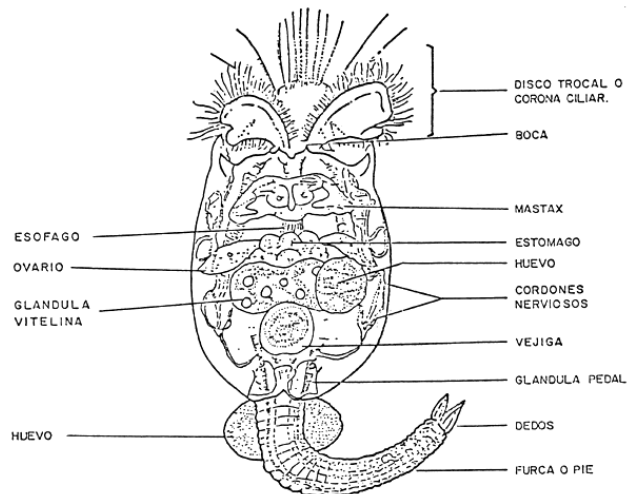


Figura 1. Representación morfológica de un rotífero.

### 2.2.2. IMPORTANCIA

Los organismos zooplanctónicos, dentro del ecosistema acuático, son excelentes indicadores de condiciones ambientales y de salud porque son sensibles a cambios en la calidad del agua. Ellos responden a bajos niveles de oxígeno, altos niveles de nutrientes, contaminantes tóxicos, abundancia o calidad del alimento y depredación. Una buena imagen de las condiciones actuales de un cuerpo de agua puede derivarse al observar los indicadores del plancton, tales como biomasa, abundancia y diversidad de especies (Casé *et al.*, 2008).

Rotíferos, cladóceros y copépodos son los grupos dominantes del zooplancton en muchos lagos y estanques de agua dulce. Aunque los copépodos son tan sensibles como otros grupos del zooplancton a la toxicidad de metales pesados; la presencia de diferentes estados larvales requiere bioensayos en diversas etapas de su desarrollo, lo cual no es factible en la mayoría de los diseños experimentales (Williamson y Reid, 2001). Los cladóceros al igual que los rotíferos muestran un desarrollo directo y por lo tanto, son ampliamente utilizados en ensayos de toxicidad. Los rotíferos son más

diversos (cerca de 2000 especies) (Koste, 1978) que los cladóceros (cerca de 560 especies) (Forró y *et al.*, 2008), aunque éste último grupo ha recibido gran énfasis en la evaluación de sustancias tóxicas incluyendo los metales pesados (Sarma y Nandini, 2006), los rotíferos también pertenecen a diferentes nichos, tales como las regiones planctónicas, bénticas, epífitas y litorales de los cuerpos dulceacuícolas.

Son un eslabón entre el fitoplancton y los consumidores secundarios, pero su importancia se acrecienta porque pueden transferir materia y energía desde bacterias y partículas detríticas de pequeño tamaño, recursos no utilizables por otros organismos planctónicos (Snell y Jansen, 1995); presentan amplia distribución, son eutélicos y filtradores, por lo que son indicadores sensibles de la calidad del agua. Por otro lado la tasa metabólica de estos organismos es rápida, provocando que tengan un consumo mayor de alimento y una mejor eficacia de asimilación de este; otra ventaja es que presentan tasas altas de crecimiento poblacional con tiempo de generación corto, induciendo en tiempos cortos una mayor multiplicación de los organismos. En la actualidad son organismos válidamente utilizados como bioindicadores para detectar los efectos tóxicos de sustancias en un sistema acuático; considerándose mucho mayor su sensibilidad, en comparación con otras especies utilizadas en ecotoxicología acuática (Snell y Janssen, 1995; Ramírez-Pérez y Sarma, 2008).

Algunas de las respuestas biológicas que tienen los rotíferos a una gran variedad de compuestos tóxicos son: a) Respuestas morfológicas: malformaciones de la lórica, corona y formación de huevos de resistencia; b) Respuestas morfométricas: crecimiento somático, relación entre el tamaño del cuerpo y tamaño del huevo así como estructura poblacional; c) Respuestas conductuales: comportamiento natatorio, conducta fototáctica, migración vertical, encuentros macho-hembra; d) Respuestas fisiológicas: tiempo de eclosión, tiempo de sobrevivencia, consumo de alimento y tasa respiratoria; e) Cambios moleculares; f) Letalidad, pruebas de toxicidad aguda: Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) y Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>); g) Pruebas de toxicidad crónica: como la demografía, tablas de vida y respuestas de crecimiento poblacional; y h) Respuestas a nivel comunidad: Interacciones depredador-presa, interacciones competitivas,

bioacumulación y transferencias hacia los niveles tróficos más altos así como cambios a nivel poblacional y de la comunidad (Sarma, 2000; Ramírez-Pérez, 2005).

Mientras que el rotífero planctónico del género *Brachionus* es frecuentemente utilizado como un organismo de bioensayo, los géneros no planctónicos como *Lepadella* y *Lecane* raramente son considerados para evaluar la toxicidad de productos químicos (Snell y Janssen, 1995). *Lecane* es uno de los más diversos géneros de rotíferos teniendo más de 150 especies bien definidas (Segers, 1995); entre ellas, *L. bulla* y *L. quadridentata* han recibido atención de ecólogos acuáticos porque estas especies no son sólo cosmopolitas sino que también se presentan con relativa abundancia en la naturaleza (Segers, 1995; Nandini *et al.*, 2005).

### 2.2.3. *Lecane quadridentata*

Pertenece a la Familia Lecanidae (Clase Monogononta), cuyas especies frecuentemente se localizan en aguas poco profundas, siendo consideradas como litorales comunes de aguas templadas y tropicales, participan en el ciclo de los detritus y se alimentan de algas planctónicas (Sarma *et al.*, 2006). Este rotífero no planctónico deposita sus huevos sobre la vegetación o el bentos -a diferencia de los rotíferos planctónicos (e.j. *Brachionus* sp.) donde las hembras los llevan consigo (Sarma *et al.*, 2005)- y es considerada una especie sensible a la toxicidad de metales (Hernández-Flores y Rico-Martínez, 2006).



Foto 1. Rotífero utilizado en este experimento (*Lecane quadridentata*). La línea es equivalente a 110  $\mu\text{m}$ .



#### 2.2.4. *Chlorella vulgaris*

Dentro de la Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales y Familia Chlorococcaceae, tenemos a *Chlorella vulgaris* cuyas colonias muestran en su mayoría formas circulares con diámetro promedio de dos milímetros, superficie lisa y una coloración verde clara; con una pared celular bien definida, carente de ornamentaciones. Las células jóvenes y adultas muestran, en su mayoría, un plasto en forma de copa que cubre casi la totalidad de la periferia celular, dejando sólo una parte al descubierto (Vega Quintero, 1996).

Los cultivos de *Chlorella sp.* contienen diversas vitaminas, lo cual favorece el valor nutricional de su biomasa. En esta última, además de carotenoides, hay también tiamina, riboflavina, piridoxina, cobalamina, biotina, ácido pantoténico y ácido nicotínico (Quintana *et al.*, 1999). Esta especie ha sido ampliamente utilizada en acuicultura como alimento vivo para peces, crustáceos y larvas de organismos acuáticos. Es preferida por muchas especies de rotíferos debido a su simplicidad estructural por lo que se ha empleado como alimento en diversos experimentos demográficos (Flores-Burgos *et al.*, 2005; Sarma *et al.*, 2007) y de toxicidad (Gama-Flores *et al.*, 2004; Nandini *et al.*, 2007).

### 2.3. PRUEBAS DE TOXICIDAD

Los métodos más comunes para detectar y evaluar los impactos de actividades humanas sobre la calidad del agua son los tradicionales análisis químicos, los análisis de bioindicadores y pruebas de toxicidad. La determinación de la concentración contaminante, a través de análisis químicos, es esencial para reconocer la tipología de la contaminación de un cuerpo de agua; pero, no permite la verificación de los impactos en la biota. El análisis de comunidades bénticas y planctónicas permite la detección de bioindicadores que integren todos los factores externos en sus respuestas fisiológicas (Rörlig *et al.*, 2007). Las pruebas de toxicidad son útiles para numerosos propósitos, entre los que se incluyen determinaciones de: a) Adaptación de las condiciones ambientales a la vida acuática; b) factores favorables y desfavorables del ambiente

como DO (demanda de oxígeno), pH, temperatura, salinidad o turbidez; c) efectos de los factores ambientales sobre la toxicidad de los residuos; d) toxicidad de los desechos sobre una determinada especie; e) sensibilidad de los organismos acuáticos ante emanaciones o agentes tóxicos; f) magnitud que ha de tener el tratamiento de los desechos para cumplir con los requerimientos de control de contaminación del agua; g) efectividad de estos métodos de tratamiento de desechos; h) tasa de descarga de vertidos permitida; e i) concordancia entre las normas de calidad del agua, los condicionamientos a los vertidos y los permisos de descarga (APHA, 1998).

El trabajo ecotoxicológico realizado con rotíferos se ubica principalmente en (Sarma, 2000):

- a) Pruebas de toxicidad aguda;
- b) Pruebas de toxicidad crónica a nivel de población;
- c) Estudios experimentales a nivel comunidad y
- d) Estudios de campo enfocados a comprender el impacto de materiales tóxicos por comparación de datos antes y después de la adición del tóxico, incluyendo índices de diversidad desde el punto de vista limnológico.

En comparación con las pruebas agudas de toxicidad, las evaluaciones crónicas consumen mucho tiempo, pero ofrecen mejores posibilidades de establecer criterios de calidad del agua para proteger al zooplancton (Kammenga y Laskowski, 2000; Snell y Joaquim-Justo, 2007). De manera convencional se consideran las respuestas demográficas y de crecimiento poblacional para evaluar el estrés en zooplancton, ya que estos estudios permiten evaluar el estado físico (o la tasa intrínseca de incremento,  $r$ ) y también ayudan a obtener datos sobre abundancias máximas (Sarma *et al.*, 2005).

Al considerar el comportamiento de los invertebrados se pueden refinar y desarrollar modelos, pruebas y protocolos de evaluación de riesgos que sean ambientalmente realistas, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar las respuestas de crecimiento poblacional de *Lecane quadridentata* (Ehrenberg, 1830) al ser expuesto a diferentes concentraciones de Cu y Hg.

### III. ANTECEDENTES

En relación al alimento utilizado en este experimento, Vega Quintero (1996) realizó estudios bromatológicos de una cepa del alga *Chlorella vulgaris* obteniendo valores de proteínas (24 pg/cél) y carbohidratos (28 pg/cél) superiores a los reportados para cuatro microalgas marinas de referencia. Quintana y colaboradores (1999) evaluaron el contenido de vitaminas (A, C, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico y biotina) en *Chlorella sp.* y concluyeron que puede usarse como un suplemento vitamínico en alimentación animal.

En México los estudios de toxicidad crónica y aguda se han realizado, en su mayoría, utilizando rotíferos del género *Brachionus* debido a que algunas especies son aceptadas internacionalmente como organismos de bioensayo en pruebas de toxicidad (ASTM, 1991; APHA, 1998). Estos estudios han fortalecido el uso de especies nativas en la evaluación del efecto de sustancias tóxicas, como los metales pesados, sobre los rotíferos. En el 2000, Sarma *et al.* compararon la sensibilidad de *Brachionus calyciflorus* y *B. patulus* a metales pesados (Cd, Hg y Cu) bajo dos niveles de alimento (*Chlorella vulgaris*); ellos reportan al Hg como el metal más tóxico para ambas especies y que *B. patulus* resulta más sensible al Cu.

Luna-Andrade *et al.* (2002) evaluaron el efecto combinado del cobre y tres concentraciones del alga *Tetraselmis suecica* sobre el crecimiento poblacional de *Brachionus plicatilis*. Concluyeron que a niveles tan bajos como 0.125 mg L<sup>-1</sup> el cobre resulta tóxico para el rotífero, pero sólo en la menor concentración de alimento (0.05 x 10<sup>6</sup>) pues al incrementar la concentración del alga se obtuvo un aumento en el crecimiento poblacional de *B. plicatilis*.

Ramírez-Pérez *et al.* (2004) realizaron un estudio donde analizaron los efectos del mercurio sobre la tabla de vida demográfica del rotífero *B. calyciflorus*. Encontraron que al aumentar la concentración de Hg en el medio, disminuyó la sobrevivencia y la edad específica de reproducción.

Gama-Flores *et al.* (2005) investigaron la interacción entre la toxicidad del cobre, temperatura y salinidad sobre la dinámica poblacional de *Brachionus rotundiformis* y, encontraron que independientemente de la salinidad y la temperatura, el cobre tuvo un efecto adverso en el crecimiento poblacional del rotífero a partir de 0.03 mg L<sup>-1</sup>; mientras que arriba de 0.125 mg L<sup>-1</sup> la población no creció.

En el mismo año, Sarma *et al.* realizaron un estudio sobre los efectos en la dinámica poblacional de *Brachionus rubens* causados por mercurio y cadmio administrados a través

del medio y el alimento (*Chlorella vulgaris*). Ellos encontraron que *B. rubens* fue 24 veces más sensible al Hg que al Cd, y que existe una relación inversa entre el crecimiento poblacional y el tiempo de exposición a los metales pesados.

Más recientemente (2008), Ramírez-Pérez y Sarma estudiaron los efectos de Hg y concentración de alimento sobre el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* y sus resultados mostraron que, independientemente de la concentración de *Chlorella vulgaris*, al aumentar la concentración del metal en el medio se disminuyó el crecimiento poblacional del rotífero.

A pesar de los numerosos estudios realizados con el género *Brachionus*, es importante considerar a otras especies de rotíferos que ocupen un lugar distinto dentro de la columna de agua para evaluar los efectos tóxicos de los metales pesados. La contaminación en sedimentos es abundante y los modelos de la Familia Brachionidae no son los ideales para evaluar su toxicidad; por lo que se ha considerado que especies litorales, o bentónicas, resultan ser útiles para manejar estos problemas.

Algunos de los estudios llevados a cabo al respecto son los de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001) quienes realizaron pruebas agudas de toxicidad con tres especies del género *Lecane* (*Lecane hamata*, *L. luna*, y *L. quadridentata*) utilizando 11 compuestos tóxicos. Ellos encontraron al cobre como el más tóxico de todos los compuestos sobre las tres especies.

Pérez-Legaspi *et al.* (2002) concluyeron una prueba de toxicidad usando la inhibición de la enzima esterasa como un biomarcador en *Lecane hamata*, *L. luna*, y *L. quadridentata*, observando que la inhibición de la esterasa por cobre es un importante signo de peligro principalmente para *L. quadridentata*, convirtiéndola en la especie más sensible a este metal. Además de que las exposiciones a bajas concentraciones (unos pocos miligramos por litro o menos) de metales pesados son suficientes para obtener efectos adversos en las tres especies de *Lecane*. Los mismos autores, en el 2003, efectuaron un estudio sobre la actividad de la fosfolipasa A2 como biomarcador utilizando las mismas tres especies de *Lecane* expuestas a distintos tóxicos. Reportaron a *L. quadridentata* como la especie más susceptible al acetato etílico y cobre, mientras que el cloruro de mercurio a bajas concentraciones inhibió la actividad de la PLA2 en *L. luna* y *L. quadridentata*; una vez más se reporta la inhibición de la actividad enzimática por el cobre en las tres especies.

Hernández-Flores y Rico-Martínez (2006) realizaron una prueba crónica de toxicidad con *Lecane quadridentata* para evaluar los efectos de plomo y mercurio. Ellos sugieren que al considerar la toxicidad del Hg debe ponerse atención especial a las condiciones fisicoquímicas y a la rapidez con que el metal se expulsa de la columna de agua. También

mencionan la capacidad enzimática de *L. quadridentata*, que podría involucrar a la especie en procesos de desintoxicación de metales pesados.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Al considerar las pruebas biológicas como herramientas para combatir la contaminación acuática se utilizan diversas especies pertenecientes al zooplancton como *Daphnia magna* (Cladocera), que a pesar de ser aceptada a nivel mundial, no es originaria de todos los países, como ocurre en México. Por lo tanto en nuestro país se ha incentivado la investigación con especies zooplanctónicas nativas, siendo un grupo principal el de los rotíferos. Debido al delicado papel que juegan en los ecosistemas acuáticos (transferencia energética, sensibilidad y bioindicación) estos organismos de talla pequeña, tasas de crecimiento muy rápidas (0.5 días para la duplicación de la población) y de fácil manipulación para su conteo, son una herramienta de investigación eficaz para evaluar los problemas de contaminación acuática. Además de que al estudiar los efectos tóxicos de diversas sustancias sobre estos organismos se nos facilita entender las posibles afectaciones que ocurren en la cadena trófica. Dentro de las sustancias tóxicas más importantes encontramos a los metales pesados, que frecuentemente llegan a los cuerpos de agua a través de los desechos de industrias mineras, aleaciones y productos agrícolas. Asimismo, en la mayoría de las investigaciones ecotoxicológicas del país se ha utilizado a rotíferos planctónicos del género *Brachionus*, por lo que es sumamente importante continuar motivando estudios que involucren especies pertenecientes a otros nichos; como los sedimentos de cuerpos dulceacuícolas que actúan como importantes reservorios de metales de origen antropogénico y son el hábitat de numerosas y variadas comunidades de organismos bentónicos que ejercen una gran influencia sobre el metabolismo de los cuerpos de agua, haciendo fundamental su importancia ecológica. Además, es trascendente realizar estudios que involucren variables poblacionales que nos ayuden a comprender el efecto de metales pesados como el cobre y el mercurio de manera cuantitativa, aparte de proporcionar información que respalde la propuesta y creación de leyes para conservar la vida acuática.

#### **V. HIPÓTESIS**

El efecto tóxico del cobre y el mercurio en *L. quadridentata* será diferente debido a sus distintos niveles de toxicidad y de la sensibilidad de la especie a cada metal. Sin embargo, se tendrá un mayor efecto negativo en las variables de crecimiento poblacional, abundancia máxima y tasa de crecimiento poblacional al aumentar la concentración del metal.

## VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los metales pesados seleccionados ( $\text{Hg}^{2+}$ , como  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , como  $\text{CuSO}_4$ ) sobre el rotífero *L. quadridentata*.

### 6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones subletales de Hg y Cu sobre el crecimiento poblacional de *L. quadridentata*.
- Estimar el efecto de diferentes concentraciones subletales de Hg y Cu sobre la abundancia máxima y la tasa de crecimiento poblacional de *L. quadridentata*.
- Comparar el efecto tóxico de Hg y Cu en *L. quadridentata*.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. OBTENCIÓN DE ORGANISMOS

El rotífero *Lecane quadridentata*, fue aislado de Xochimilco, D. F. y se cultivó a partir de una cepa de hembras partenogenéticas del Laboratorio de Zoología Acuática de la FES Iztacala, UNAM. Los rotíferos se cultivaron en un medio de agua semidura reconstituida (medio de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, (EPA)) bajo una dieta exclusiva de la microalga verde *Chlorella vulgaris*, en una densidad de  $0.5 \times 10^6$  a  $1.0 \times 10^6$  céls/ml. El medio EPA se preparó disolviendo 1.9 g  $\text{NaHCO}_3$ , 1.2 g  $\text{CaSO}_4$ , 1.2 g  $\text{MgSO}_4$  y 0.004 g KCL en 20 L de agua destilada. Se mantuvieron con temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , aireación constante e iluminación continua. Tres veces a la semana se realizó el cambio total del medio donde se cultivaron los rotíferos, desechando el sedimento con restos de organismos muertos así como materia orgánica en general. Los rotíferos se filtraron con una malla de 50 micras de apertura, enseguida se lavaron con medio EPA e inmediatamente fueron depositados en nuevo medio con alimento.

### 7.2. OBTENCIÓN DE ALIMENTO

La microalga *Chlorella vulgaris* se cultivó en botellas de plástico de 2 L de capacidad, con medio basal de Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988) y un pH de 7.5. Cada tercer día se enriqueció el medio con bicarbonato de sodio ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ). Se mantuvo una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , aireación constante e iluminación directa en forma continua (aprox. 4500 luxes).

Se utilizaron concentraciones de  $0.5$  a  $1 \times 10^6$  céls/ $\text{ml}^{-1}$  para iniciar los cultivos, con el propósito de garantizar la presencia de una gran cantidad de células con la calidad nutritiva adecuada. Los cultivos se dejaron crecer hasta que alcanzaron su fase exponencial, a los siete días. Una vez que se obtuvo la concentración adecuada, las botellas se retiraron de la aireación y se mantuvieron en refrigeración 2 ó 3 días para permitir la sedimentación y concentración de las células. Posteriormente, se decantó el medio sobrenadante para eliminar las posibles toxinas que pudieran dañar el cultivo de



rotíferos. Para los experimentos, el alga se concentró siendo centrifugada a 3000 rpm y resuspendida con agua destilada. Habiendo realizado la cosecha del alga concentrada, se mantuvo en refrigeración (3 a 4°C).

Empleando una cámara de Neubauer se determinó la densidad del alga, en los experimentos se utilizó *C. vulgaris* lo más fresca posible, con la finalidad de evitar posibles alteraciones en los resultados debido al envejecimiento de las células.

### 7.3. PREPARACIÓN DE LOS TÓXICOS

Las soluciones en grado analítico (1 mg/L, concentración nominal) de cobre (como  $\text{CuSO}_4$ ) y mercurio (como  $\text{HgCl}_2$ ) fueron preparadas por separado utilizando agua destilada; en base a los datos de la concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$ ) de ambos metales para *Brachionus patulus*, disponibles en la literatura (Sarma *et. al.*, 2000 y 2001). Se seleccionaron 5 concentraciones (siendo la más baja  $0.003125 \times \text{CL}_{50}$  y la más alta  $0.05 \times \text{CL}_{50}$  para cada metal): 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 y 5.0  $\mu\text{g/L}$  para Cu y 0.0844, 0.1688, 0.3375, 0.675 y 1.35  $\mu\text{g/L}$  para Hg.

A partir de las soluciones stock se realizaron diluciones 1:100 en agua destilada, con la finalidad de poder tomar los volúmenes requeridos para obtener las concentraciones sub-letales de cada tóxico. Posteriormente se realizaron los cálculos necesarios para conocer las cantidades de Hg y Cu que se agregarían en cada tratamiento.

### 7.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las condiciones generales de los experimentos fueron las siguientes: densidad de alimento= $1.0 \times 10^6$  céls/ml (=0.3  $\mu\text{g C/ml}$ ); pH 7.0-7.5; temperatura  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e iluminación fluorescente continua pero difusa. El medio y alimento utilizado en las pruebas fue renovado diariamente. Se utilizaron envases de plástico transparente, con 50 ml de capacidad, con 20 ml de medio cada uno.

Los rotíferos de los controles no se expusieron al Cu ni al Hg. Para cada tratamiento se usaron cuatro réplicas. En total se emplearon 44 vasos de prueba (=2 metales pesados X

5 concentraciones X 4 réplicas + 4 controles). Los experimentos de crecimiento poblacional se iniciaron con 20 individuos de *L. quadridentata* por réplica, conteniendo 20 ml del medio con el metal específico y la concentración de *Chlorella vulgaris* en densidad de  $1.0 \times 10^6$  céls/ml.

Al iniciar el experimento, se contó a diario el número de individuos vivos en cada vaso y se transferían a otro con la respectiva concentración del metal y alimento, mediante una pipeta Pasteur. Posteriormente, cuando la población total sobrepasó los 100 individuos, se utilizaron alícuotas de 1ml para el conteo, para esto se hizo uso de una micropipeta automática.

Los experimentos terminaron después de 24 días, momento en que en la mayoría de las pruebas la población comenzó a declinar. Basados en los datos recolectados, se derivó la tasa de incremento poblacional ( $r$ ) haciendo uso de la siguiente ecuación exponencial

(Case, 2000): 
$$r = \frac{(\ln N_t - \ln N_0)}{t}$$

En donde:

$r$ = tasa de crecimiento poblacional por día

$N_t$ = número de individuos de la población después del tiempo  $t$

$N_0$ = número de individuos de la población inicial

$t$ = tiempo en días

Las diferencias en las densidades poblacionales máximas y las tasas de incremento poblacional de *L. quadridentata* bajo los diferentes tratamientos fueron analizadas utilizando análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, con el software Statistica (Version 5, StatSoft Inc., Oklahoma).

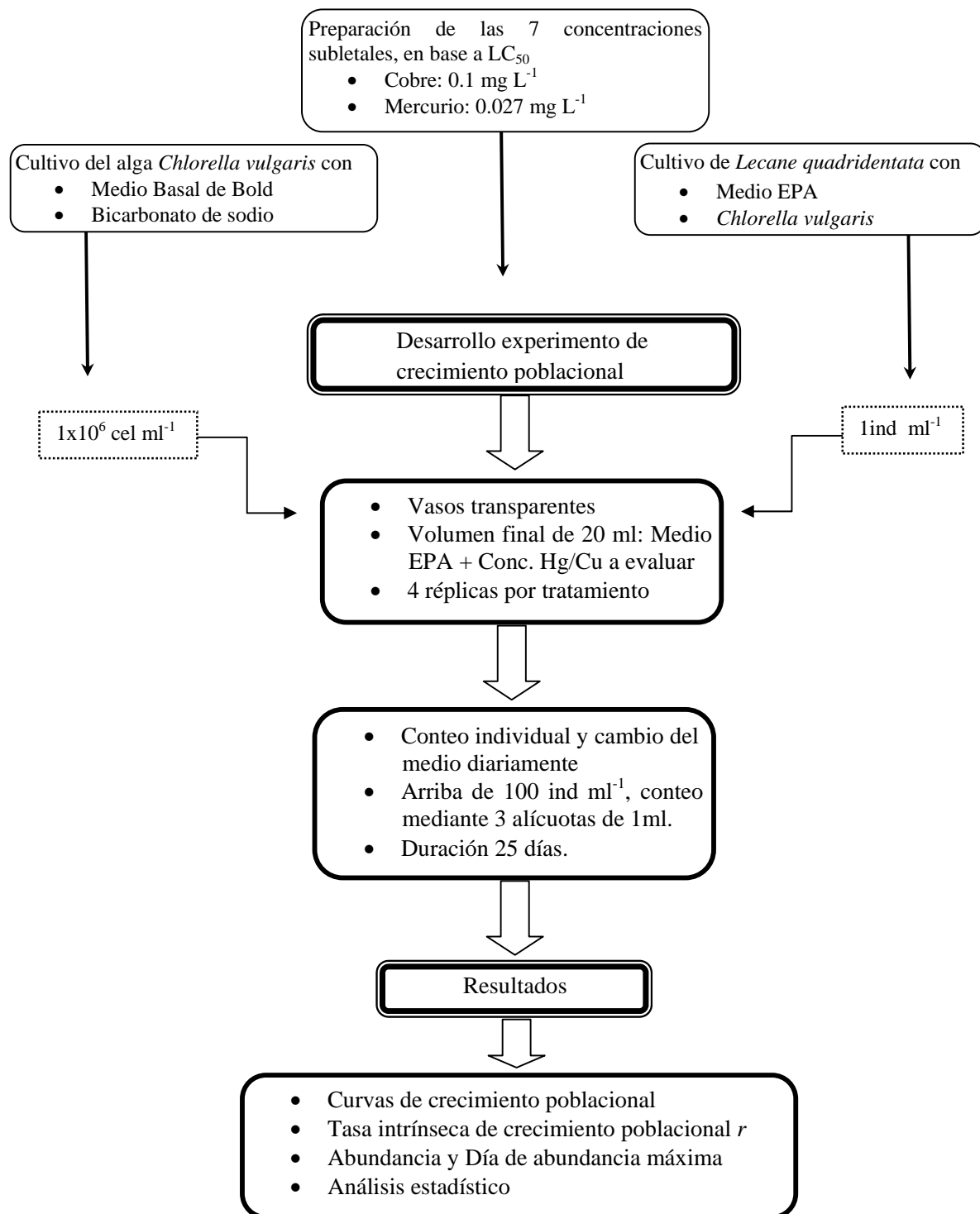


Figura 2. Actividades realizadas en este trabajo.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. COBRE

La curva de crecimiento poblacional de *Lecane quadridentata*, en el tratamiento sin sulfato de cobre, muestra una fase logarítmica que se extiende hasta los 15 días con una fase exponencial que continúa hasta el día 23 cuando la población sufrió una drástica reducción. En las concentraciones más altas (2.5 y 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) el rotífero no presentó algún crecimiento. Las concentraciones de 1.25 y 0.625  $\mu\text{g ml}^{-1}$  manifestaron una disminución de su fase logarítmica respecto al control, manteniéndose hasta los primeros 5 días; mientras que la fase exponencial duró 15 y 18 días respectivamente. Para la menor concentración (0.312  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) se tuvo una fase inicial de 10 días y una fase exponencial de 12 días, siendo muy similar a la curva del tratamiento control, tal como se muestra en la Figura 3.

La abundancia máxima del grupo control fue de  $63 \pm 5 \text{ ind. ml}^{-1}$  a los 24 días, mientras que los tratamientos con metales variaron de 1 a 58  $\text{ind. ml}^{-1}$  dependiendo de la concentración. Tal como se muestra en la Figura 4, la abundancia máxima fue de 58  $\text{ind. ml}^{-1}$  en la concentración de 0.625  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , alcanzada a los 24 días; presentándose una reducción del 8% en el crecimiento comparado con el tratamiento sin cobre. Para las concentraciones de 0.312 y 1.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  las abundancias máximas se alcanzaron al día 24 y fueron de 53 y 48  $\text{ind. ml}^{-1}$ , con una disminución del crecimiento del 15 y 24 % respectivamente. En el caso de las concentraciones más altas (2.5 y 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ ) la reducción poblacional fue del 98 % con respecto al grupo control.

Según se observa en la Figura 5, la tasa de incremento poblacional ( $r$ ) varió de  $+0.23 \pm 0.01$  a  $-0.12 \pm 0.02$ , dependiendo de la concentración. En las concentraciones más altas de  $\text{CuSO}_4$  (2.5 y 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) no se registró crecimiento; mientras que en las concentraciones más bajas (0.312 y 0.625  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) se presentó una disminución de hasta el 18 % respecto al control.

La densidad máxima y la tasa de incremento poblacional de *L. quadridentata* se vieron significativamente afectadas por la concentración de Cu en el medio ( $p < 0.001$ , ANOVA, Tabla 1).

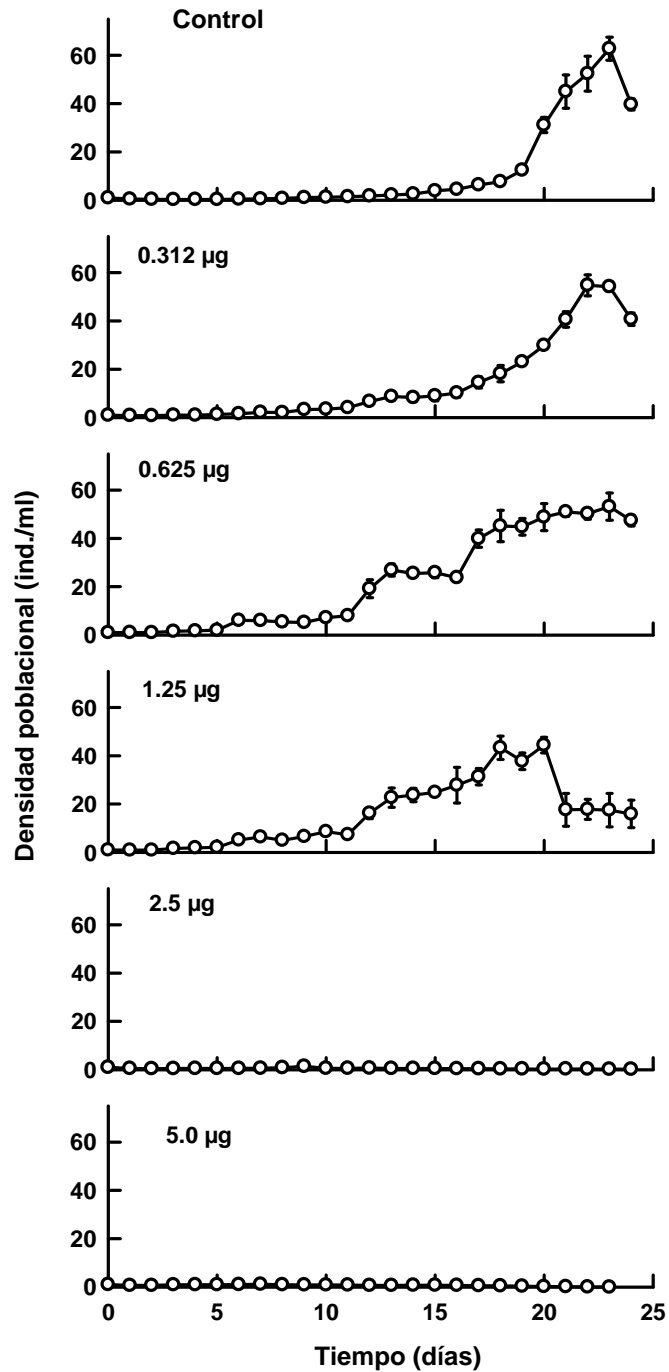


Figura 3. Curvas de crecimiento poblacional de *Lecane quadridentata* expuesto a diferentes concentraciones nominales ( $\mu\text{g/L}$ ) de  $\text{CuSO}_4$  con una densidad de  $1 \times 10^6$  céls/ml de *Chlorella vulgaris* como alimento. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar en base a las cuatro réplicas.

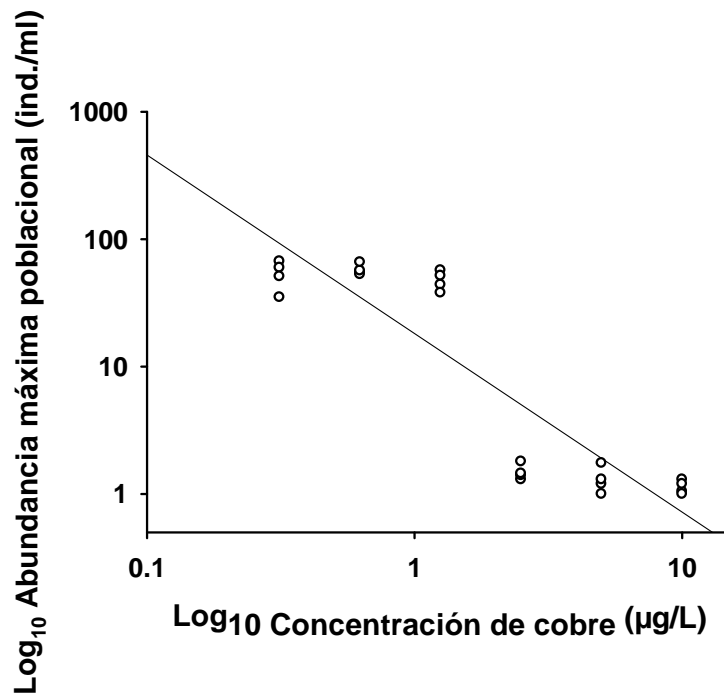


Figura 4. La relación entre la densidad máxima poblacional (ind./ml) de *L. quadridentata* y las concentraciones nominales (µg/L) de Cu. Se muestran los datos para cada concentración del metal.

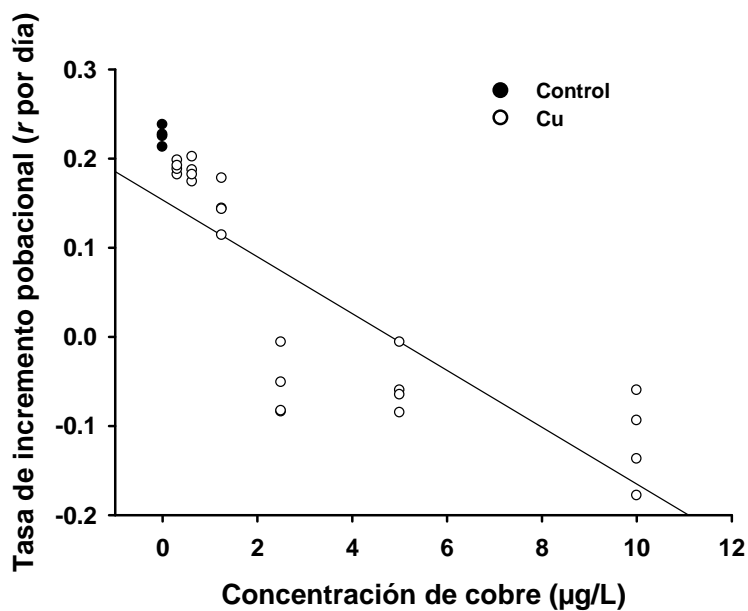


Figura 5. Relación entre la tasa de incremento poblacional (*r* por día) de *L. quadridentata* y las concentraciones nominales (µg/L) del Hg. Se muestran los datos para cada concentración del metal.

Tabla 1. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado sobre la abundancia máxima poblacional (ind./ml) y la tasa diaria de incremento poblacional ( $r$ ) de *Lecane quadridentata* expuesto a diferentes concentraciones nominales ( $\mu\text{g/L}$ ) de Cu.

Fuente de variación	GL	SC	CM	F
Cu				
Abundancia poblacional máxima entre los niveles de metales pesados		6	20508.52	3418.09
62.39***				
Error	21	1150.56	54.79	
Tasa de incremento poblacional entre los niveles de metales pesados				
89.92***		6	0.510	0.085
Error	21	0.0198	0.0009	

GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F:  $F$ -ratio, \*\*\*  
 $=p<0.001$



## 8.2. MERCURIO

La fase logarítmica del crecimiento poblacional de *Lecane quadridentata* fue de 15 días y una fase exponencial de 9 días, en el tratamiento sin mercurio. En las concentraciones más bajas (0.084 y 0.169  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ ) la fase inicial del crecimiento se mantuvo hasta los  $10 \pm 2$  días, con una fase exponencial de  $10 \pm 3$  días (hasta el día 24). Sin embargo, en la concentración de 0.338  $\mu\text{g ml}^{-1}$  se observa una lucha de la población para sobrevivir ya que para el día 10 se manifiesta un incremento poblacional, que trata de mantenerse hasta el día 22, donde comienza a disminuir drásticamente. Para las concentraciones altas (0.675 y 1.35  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$ ) el comportamiento de la curva se retardó un poco respecto al control, con una fase inicial de  $17 \pm 1$  días y una fase exponencial de sólo  $5 \pm 1$  días (Fig. 6).

La abundancia máxima de *Lecane quadridentata* fue de 22 ind.  $\text{ml}^{-1}$ , en la concentración de 0.084  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  alcanzada a los 25 días, y representó una disminución del 66 % del crecimiento poblacional. En la de 0.169  $\mu\text{g ml}^{-1}$  fue de 19 ind.  $\text{ml}^{-1}$  (a los 24 días), mientras que en las de 0.338 y 0.675  $\mu\text{g ml}^{-1}$  se obtuvieron 13 y 14 ind.  $\text{ml}^{-1}$ , con un 70, 79 y 77 % de reducción poblacional respectivamente. A 1.35  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  se obtuvo una abundancia máxima de 7 ind.  $\text{ml}^{-1}$  al llegar a los 24 días, esta concentración tuvo un descenso poblacional del 88 %. Tal como se muestra en la Figura 7, el grupo control alcanzó una abundancia máxima poblacional de  $63 \pm 5$  ind.  $\text{ml}^{-1}$ .

El valor de la tasa diaria de incremento poblacional ( $r$ ) para el control fue de  $+0.23 \pm 0.01$ . Para las concentraciones mayores (0.338, 0.675 y 1.35  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) el valor de  $r$  fue de  $0.12 \text{ d}^{-1}$ , representando una disminución aproximada del 46% en comparación con el grupo control. En las concentraciones menores (0.084 y 0.169  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) la disminución fue hasta del 29% con 0.16 y  $0.17 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. En general, el valor de  $r$  disminuyó al aumentar la concentración de mercurio en el medio (Fig. 8).

Estadísticamente, la densidad máxima y la tasa de incremento poblacional de *L. quadridentata* se vieron afectadas de manera significativa por la concentración de Hg en el medio ( $p < 0.001$ , ANOVA, Tabla 2).

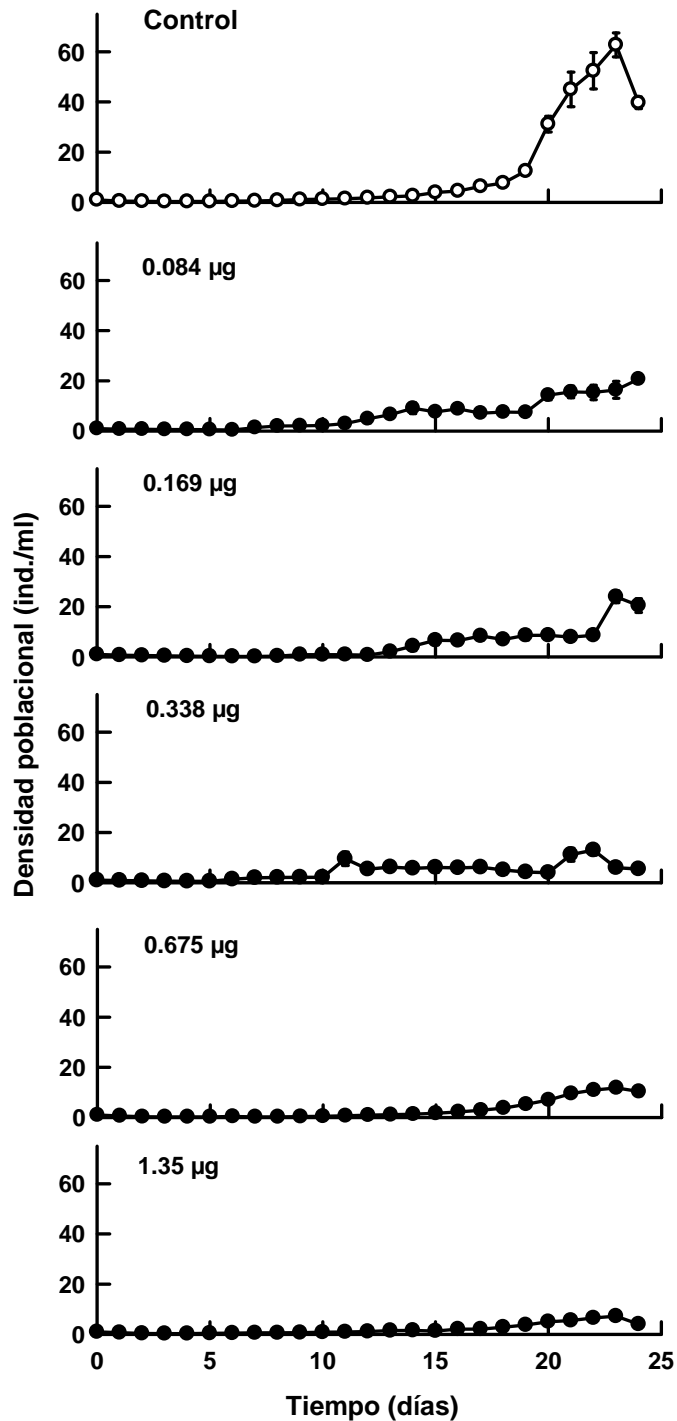


Figura 6. Curvas de crecimiento poblacional de *Lecane quadridentata* expuesto a diferentes concentraciones nominales ( $\mu\text{g/L}$ ) de  $\text{HgCl}_2$  con una densidad de  $1 \times 10^6$  céls/ml de *Chlorella vulgaris* como alimento. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar en base a las cuatro réplicas.

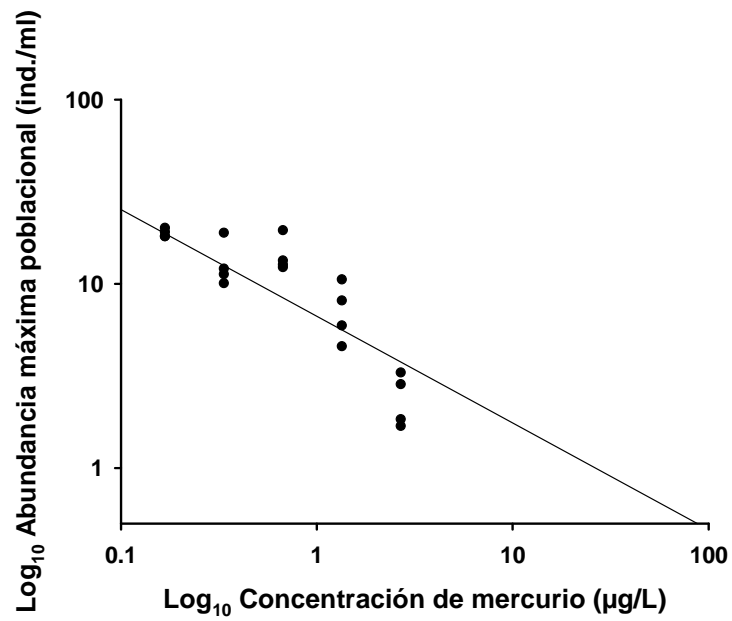


Figura 7. La relación entre la densidad máxima poblacional (ind./ml) de *L. quadridentata* y las concentraciones nominales (µg/L) de Hg. Se muestran los datos para cada concentración del metal.

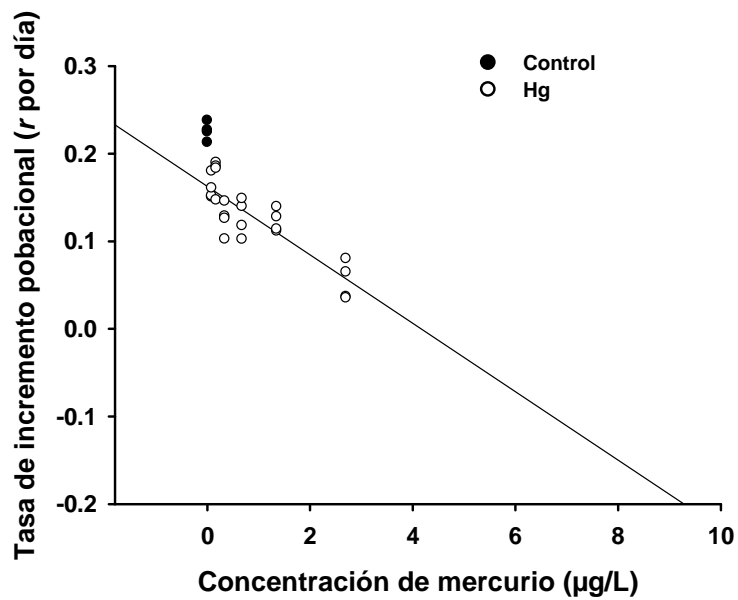


Figura 8. Relación entre la tasa de incremento poblacional (*r* por día) de *L. quadridentata* y las concentraciones nominales (µg/L) de Hg. Se muestran los datos para cada concentración del metal.

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado sobre la abundancia máxima poblacional (ind./ml) y la tasa diaria de incremento poblacional ( $r$ ) de *Lecane quadridentata* expuesto a diferentes concentraciones nominales ( $\mu\text{g/L}$ ) de Hg.

Fuente de variación	GL	SC	CM	F
Hg				
Abundancia poblacional máxima entre los niveles de metales pesados		6	9537.33	1589.56
84.28***				
Error	21	396.05	18.86	
Tasa de incremento poblacional entre los niveles de metales pesados		6	0.068	0.011
37.97***				
Error	21	0.006	0.0003	

GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F:  $F$ -ratio, \*\*\*  
 $=p<0.001$

## IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Debido a que diferentes cambios en las condiciones ambientales pueden influir la sensibilidad de los organismos a varios tóxicos, como los metales pesados, es de suma importancia identificar tales organismos para realizar estudios que permitan determinar las concentraciones mínimas permisibles en los cuerpos de agua mexicanos; además de conocer las especies que fungirán como indicadores de la contaminación acuática. Estos bioensayos ecotoxicológicos resultan útiles cuando la integración de información proporciona recomendaciones para los marcadores de decisión encargados de proteger al medio ambiente. Actualmente, nuestro país cuenta con un cuerpo sustancial de leyes y regulaciones que, al hacerse respetar, podrían garantizar ecosistemas saludables para la vida silvestre y buena calidad ambiental para los seres humanos. Las especies litorales y planctónicas de rotíferos transfieren energía desde los detritus y algas bénticas hasta los depredadores vertebrados e invertebrados; jugando un papel muy importante dentro de los ecosistemas dulceacuícolas ya que los contaminantes también pueden encontrarse adsorbidos en los sólidos en suspensión y sedimentos, donde pueden acumularse y almacenarse en la parte inferior de los cuerpos de agua por años o décadas, representando un potencial peligro para animales bentónicos y la vida acuática en caso de existir resuspensión (Nandini y Sarma, 2001; Mendoza-Cantú *et al.*, 2007).

De manera complementaria, la consideración del agua y alimentos como fuentes de metales también es importante porque el metal tomado de los alimentos no necesariamente se almacena en el mismo órgano que el tomado del agua y los efectos de ambos pueden diferir (Hare *et al.*, 2003). En este trabajo encontramos que, independientemente del tratamiento, el rotífero litoral tiene un crecimiento poblacional lento en comparación con especies planctónicas como *Brachionus* y *Keratella*. La larga fase logarítmica de *L. quadridentata* observada en este estudio (15 días en el grupo sin tóxico) ha sido reportada para otras especies de *Lecane* -como *L. inermis*- pues normalmente las especies no planctónicas tienen una tasa de crecimiento baja y un largo periodo (2-3 semanas) de adaptación. *L. inermis* tiene una fase inicial de aproximadamente 15 días independientemente de la concentración de alimento utilizada;

sin embargo, al aumentar la concentración, el crecimiento poblacional se ve afectado negativamente (Sarma *et al.*, 2006).

Comparados con el grupo control, los tratamientos con tóxicos tuvieron patrones de crecimiento diferentes; presentando una tendencia general a disminuir la fase logarítmica al aumentarse la concentración del metal en el medio.

En el caso del cobre, el efecto tóxico se presentó desde la concentración de  $0.625 \mu\text{g ml}^{-1}$  (0.625% de la  $CL_{50}$ ) afectando la fase logarítmica del crecimiento poblacional ya que sólo se mantuvo hasta el quinto día. La curva de crecimiento que se observa en las concentraciones de 1.25 y  $0.625 \mu\text{g ml}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  es irregular en comparación con el grupo control. Para la concentración de  $0.312 \mu\text{g ml}^{-1}$  se tiene un comportamiento de la curva similar al de la curva control, aunque con una fase inicial un poco más corta (12 días) y una fase exponencial de 13 días, disminuyendo a partir del día 24. Las irregularidades de las curvas parecen representar que la población lucha constantemente por crecer y adaptarse a las condiciones del medio, por lo que se observa que, en las concentraciones más altas (2.5 y  $5.0 \mu\text{g/L}$  de  $\text{CuSO}_4$ ) la población de *L. quadridentata* no presentó crecimiento significativo pues la población se redujo a menos de 2 ind./ml. En los tratamientos con mercurio, el aumento de la concentración ( $0.675$  y  $1.35 \mu\text{g/L}$  de  $\text{HgCl}_2$ ) hizo mayor la fase logarítmica de *L. quadridentata*, pero redujo la fase exponencial alcanzando bajas densidades poblacionales. Las menores concentraciones ( $0.084$ ,  $0.169$  y  $0.338 \mu\text{g/L}$  de  $\text{HgCl}_2$ ) mostraron una curva de crecimiento irregular comparada con la del grupo control -15 días de fase logarítmica y 9 días en fase exponencial-, a causa de un intento de la población para adaptarse al medio.

Estas diferencias de comportamiento son posibles debido al tipo de efecto causado por cada uno de los dos metales pesados utilizados. Se sabe que a bajas concentraciones el Cu incrementa el rendimiento productivo debido a la hormesis (Calabrese y Baldwin, 2003), lo cual resultó en nuestro estudio como una reducida fase logarítmica. La hormesis posiblemente ocurre cuando una especie está bajo algún estrés moderadamente bajo,

provocándose un cambio en la asignación de energía asimilada de ciertas actividades metabólicas o respuestas reproductivas para compensar el descenso en la reproducción. En este respecto se ha reportado (Gama-Flores *et al.*, 2005) que el Cu tiene efectos adversos en el crecimiento poblacional de *Brachionus rotundiformis* a concentraciones desde 0.03 mg/L y desde 0.0375 mg/L para *B. calyciflorus* (Gama-Flores *et al.*, 2007), lo que concuerda con Snell y Moffat (1992) quienes reportan que la concentración donde no se observa algún efecto para este género (NOEC) es de 0.02 mg/L de cobre. Sin embargo, en este estudio se observó que la población de *L. quadridentata* disminuyó significativamente a partir de 0.00125 mg/L; lo que nos lleva a pensar que esta especie es mucho más sensible a la presencia del cobre que algunas especies de *Brachionus*.

En el presente estudio se utilizaron las mismas proporciones de CL<sub>50</sub> reportadas para Cu y Hg (Sarma *et al.*, 2000). Sin embargo, en la más baja concentración de cobre probada, 0.312% de LC<sub>50</sub>, el crecimiento de *L. quadridentata* fue similar al control, mientras que en la misma proporción para el mercurio, el crecimiento poblacional del rotífero fue afectado adversamente. Esto se debe al hecho de que, comparado con el Cu, el mercurio es altamente tóxico para los organismos (Chapman *et al.*, 2003). Mientras el cobre resulta tóxico para el zooplancton en mg, el mercurio lo es a nivel de microgramos (Gama-Flores *et al.*, 2009; Sarma *et al.*, 2008). Por tanto, en este estudio el Hg resultó ser más tóxico que el Cu para *L. quadridentata*, puesto que a partir de concentraciones tan pequeñas como 0.169 µg ml<sup>-1</sup> (0.61% de la CL<sub>50</sub>) la población fue afectada negativamente, reduciéndose hasta en un 70%.

Al seguir el criterio de la relación inversamente proporcional del crecimiento poblacional de *L. inermis*, respecto al aumento de la concentración de alimento (Sarma *et al.*, 2006); tenemos en este trabajo que al haber utilizado una densidad de alimento de 1 x 10<sup>6</sup> céls/ml (*Chlorella vulgaris*), probablemente se afectó al crecimiento poblacional de *L. quadridentata* obteniendo así una abundancia máxima relativamente pequeña para el grupo control (63 ind. ml<sup>-1</sup>) ya que *Lecane inermis* alcanzó abundancias máximas de alrededor de 120-180 ind./ml al ser cultivado con diferentes densidades de *Chlorella* (0.1x10<sup>6</sup> a 0.8x10<sup>6</sup> céls/ml). La explicación es que generalmente, a una determinada



densidad de alimento, las especies de zooplancton más pequeñas son numéricamente más abundantes que las especies más grandes (Nandini *et al.*, 2007). De esta manera, los miembros más pequeños del género *Lecane*, como *Lecane inermis* (<100  $\mu\text{m}$ ) podrían alcanzar densidades tan altas como 200 ind./ml., y puesto que *L. quadridentata* es relativamente más grande (longitud media del cuerpo, 120  $\mu\text{m}$ , excluyendo los dedos), estas abundancias máximas fueron menores que las reportadas para *L. inermis* (Sarma *et al.*, 2006). Estos resultados de abundancia máxima (63 ind.  $\text{ml}^{-1}$ ) son muy similares a los encontrados por Enriquez García *et al.* (2003), quienes demuestran que el crecimiento de algunos rotíferos litorales (*Lecane quadridentata* y *Platyias quadricornis*) es bajo ya que alcanzan su máxima densidad después de los 20 días, reportando una abundancia máxima de 50 ind.  $\text{ml}^{-1}$  para *L. quadridentata* (utilizando una concentración de alimento igual a la de este estudio). En el caso del cobre, las abundancias variaron de 1 a 58 ind./ml dependiendo de la concentración; mientras que para el mercurio se tuvo un rango de 7 a 22 ind./ml. Con estos datos nos damos cuenta que los tratamientos con cobre y mercurio tienen una relación inversa entre la abundancia máxima poblacional y las concentraciones de estos metales en el medio. El comportamiento de las curvas de crecimiento poblacional de *L. quadridentata* bajo la influencia del cobre, es más parecido a la respuesta del control a diferencia de los tratamientos con mercurio.

A este respecto tenemos que, Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001) realizaron pruebas de toxicidad aguda con *L. hamata*, *L. luna* y *L. quadridentata* utilizando diferentes compuestos tóxicos y encontraron al cobre como el más tóxico de los 11 compuestos evaluados, con una  $\text{CL}_{50-48}$  de 0.23, 0.06 y 0.33  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente, considerando a *L. quadridentata* como la especie más resistente al cobre. En este estudio se utilizó como referencia una  $\text{CL}_{50}$  30% menor que la reportada en el trabajo anterior, y se encontró que desde la concentración de 0.0025  $\text{mg L}^{-1}$  (2.5% de la  $\text{CL}_{50}$ ) se inhibe el crecimiento poblacional del rotífero bentónico; entendiendo que no todas las cepas de rotíferos cultivados se comportan de igual manera, además de que varían las condiciones de laboratorio en que son cultivadas, se explica la diferencia de sensibilidad entre las

poblaciones de *L. quadridentata* utilizadas en ambos trabajos. Aunque sin duda existen diferencias en las dinámicas poblacionales y características ecológicas entre las especies del género, se ha comprobado que bajas concentraciones de cobre inhiben la actividad enzimática de la esterasa en algunas especies de *Lecane*, además de considerar a este metal uno de los compuestos más tóxicos para estos rotíferos (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2003).

Dependiendo de la concentración, los compuestos de cobre pueden ser letales para el zooplancton vía ingestión dietética (e.j. alga) o directamente a través del medio como absorción acuosa. Se ha reportado (Gama-Flores *et al.*, 2007) que casi la totalidad de las variables demográficas de *Ceriodaphnia dubia* son afectadas por este metal a 0.1, 0.2 y 0.4 mg L<sup>-1</sup>, independientemente que se evalúen estos factores en una ruta interactiva o de manera individual. En el mismo año, Nandini y colaboradores señalaron que el cobre (0.017-0.071 mg L<sup>-1</sup>) impacta negativamente la fecundidad, la fase reproductiva y el crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* cuando se asocia con el zinc; sin embargo, reportan que de manera individual el Cu es 30% más tóxico que el Zn en este cladóceros. De acuerdo a la información de la literatura (Tabla 3) nos damos cuenta que los cladóceros son menos sensibles (más resistentes) al cobre que los rotíferos; por lo que resulta esencial continuar con los estudios sobre este grupo del zooplancton pues juegan un papel primordial en la cadena trófica de los cuerpos dulceacuícolas.

Tabla 3. Concentraciones Letales Medias (CL<sub>50</sub>) de cobre reportadas para zooplancton.

Especie	CL <sub>50</sub> (mg. L <sup>-1</sup> de Cu)	Tiempo exposición	Referencia
<i>Brachionus rotundiformis</i>	0.03125, 0.0625, 0.125, 0.250 (CuSO <sub>4</sub> )	16 días	Gama-Flores <i>et al.</i> (2005)
<i>B. calyciflorus</i>	0.0375, 0.075, y 0.15 (CuSO <sub>4</sub> )	14 días	Gama-Flores <i>et al.</i> (2007)
<i>B. calyciflorus</i>	0.1-0.8	24h	Ferrando <i>et al.</i> (1993)
<i>Lecane hamata</i>	0.23	48-h	Perez-Legaspi y Rico-Martinez (2001)
<i>L. luna</i>	0.060		
<i>L. quadridentata</i>	0.33		
<b>Copépodos</b>			
<i>Acartia tonsa</i>	0.5-0.11(CuCl <sub>2</sub> )	48-h	Leaes Pinho <i>et al.</i> (2007)
<b>Cladóceros</b>			
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0.1, 0.2 y 0.4 (CuSO <sub>4</sub> )	3, 6, 12 y 24-h	Gama-Flores <i>et al.</i> (2007)
<i>C. rigaudii</i>	0.01-500	48-h	Azad Mohammed (2007)
<i>Daphnia magna</i>	0-125 µg L <sup>-1</sup> (CuCl <sub>2</sub> )	21 días	Bossuyt <i>et al.</i> (2003)
	10- 390.62 µg L <sup>-1</sup> (CuCl <sub>2</sub> )	48-h	Atienzar <i>et al.</i> (2001)
	0.5 (CuCl <sub>2</sub> )	21 días	De Schampelaere <i>et al.</i> (2007)
	0.075-0.13 (CuCl <sub>2</sub> )	21 días	Muysen y Janssen (2007)
<i>Moinodaphnia macleayi</i>	0.01-0.035	72-h	Orchard <i>et al.</i> (2002)

Por otro lado, numerosos estudios han reportado al mercurio como altamente tóxico a concentraciones menores de 0.005 mg/L provocando una reducción en sobrevivencia, reproducción y crecimiento poblacional de varias especies de *Brachionus* (Sarma *et al.*, 2005; Ramírez-Pérez, 2004). Para el caso de rotíferos no planctónicos, Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001) realizaron pruebas agudas de toxicidad en *Lecane hamata*, *L. luna* y *L. quadridentata*, donde reportan una CL<sub>50</sub>-48 para cloruro de mercurio que va de 1.37 a 0.4 mg L<sup>-1</sup> para las tres especies, considerando a *L. quadridentata* la más sensible a este compuesto. Además de que, al enfocarse en la inhibición de la Fosfolipasa A2 (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2003) muestran que bajas concentraciones de cloruro de mercurio inhiben la enzima en *Lecane luna* y *L. quadridentata*; considerando a estas especies más sensibles que *Brachionus calyciflorus*. Sin embargo, en este caso al utilizar una CL<sub>50</sub> de 0.027 mg/L, se muestra que la toxicidad del mercurio en esta especie puede manifestarse a concentraciones mucho menores, tomando en cuenta también las variaciones de cada cepa. Secundariamente, se muestra una vez más que *Lecane quadridentata* resulta ser más sensible al cloruro de mercurio en comparación con el sulfato de cobre; en esta parte no debemos olvidar que los metales tienen diferentes formas de acción dependiendo de sus propiedades y de las especies utilizadas en las pruebas; además debe considerarse que, aunque la sensibilidad depende del taxón, no

todas las variables de la historia de vida son iguales y consistentemente sensibles a un determinado estrés. También hay que tomar en cuenta que los diferentes miembros del zooplancton reaccionan de manera individual y específica a la presencia de mercurio en el medio; lo que nos lleva a darnos cuenta que la contaminación por metales pesados también altera la composición de las poblaciones de un ecosistema ya que cada especie responde de diferente manera a las concentraciones de contaminantes y, por tanto, acumula en mayor o menor medida determinados metales pesados (Cervantes *et al.*, 1999).

Tabla 4. Concentraciones Letales Medias (CL<sub>50</sub>) de mercurio reportadas para zooplancton.

Especie	CL <sub>50</sub> (mg. L <sup>-1</sup> de Hg)	Tiempo exposición	Referencia
<i>Brachionus patulus</i>	0.027 (Hg Cl <sub>2</sub> )	24-h	Sarma <i>et al.</i> (2001)
<i>Lecane hamata</i>	1.37	48-h	Perez-Legaspi y Rico-Martinez (2001)
<i>Lecane luna</i>	0.450		
<i>Lecane quadridentata</i>	0.40		

Las tasas de incremento poblacional de *Brachionus* varían de 0.2 a 2.0 dependiendo de las condiciones de prueba (Sarma *et al.*, 2001). Sin embargo, comparado con las especies de *Brachionus*, el género *Lecane* usualmente tienen tasas de crecimiento mucho menores  $r < 0.3$  (Sarma *et al.*, 2006; Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 1998). En el presente trabajo, observamos una  $r$  cercana al intervalo reportado en la literatura para las especies de *Lecane*. Las bajas tasas de crecimiento de *Lecane*, en comparación con *Brachionus*, se deben a la menor producción de huevos y el mayor tiempo de eclosión de los huevos partenogenéticos (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 1998; Sarma y Rao, 1991); por lo que, tanto la producción de huevos como el tiempo de eclosión son sensibles al estrés provocado por los metales pesados. Cuando *L. quadridentata* se expuso al cobre y al mercurio, las tasas de crecimiento fueron mucho menores que en los controles ( $+0.23 \pm 0.01$  a  $-0.12 \pm 0.02$ ).

De manera paralela, se debe tomar en cuenta que la severidad de la contaminación depende no sólo del contenido total del metal, sino también de la proporción de sus

formas móviles y biodisponibles (Morton-Bermea *et al.*, 2008). Hoy en día los metales pesados tienen un gran significado como indicadores de la calidad ecológica de todo flujo de agua debido a su toxicidad y muy especialmente al comportamiento bioacumulativo (Moalla *et al.*, 1998). Así, Hernández-Flores y Rico-Martínez (2006) suponen que *Lecane quadridentata* presenta importantes actividades de desintoxicación y bioacumulación de metales pesados, lo que resulta trascendente considerando que el mercurio es uno de los pocos metales que pueden ser bioacumulados y biomagnificados, siendo fácilmente transformado de las formas inorgánicas menos tóxicas a los compuestos orgánicos más tóxicos en tejidos de peces. Rotíferos del género *Lecane*, muy frecuentemente son utilizados para alimentar larvas de peces, y se encuentran dentro del zooplancton más común en cuerpos de agua superficial en ambientes dulceacuícolas tropicales y templados; por lo que se considera importante continuar con estudios que apoyen este indicio de bioacumulación en *L. quadridentata*.

Por último cabe resaltar que en nuestro país existen leyes encargadas de proteger la calidad ambiental que quizá necesiten ser reevaluadas en base a las investigaciones realizadas recientemente con la biota acuática. Una de ellas es la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (DOF, 1997), que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. En esta norma se establece un promedio al mes de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  y  $0.005 \text{ mg L}^{-1}$  (de cobre y mercurio respectivamente) como desecho permisible en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales para la protección de la vida acuática. No obstante, estas cantidades resultan demasiado altas para la mayoría de especies acuáticas como los rotíferos y demás componentes del zooplancton. Tal como se mostró en este estudio, pues el cobre y el mercurio resultaron ser altamente tóxicos para *Lecane quadridentata* en concentraciones muy por debajo de los límites establecidos en la Norma Oficial Mexicana (desde  $0.625 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $0.084 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  para cada uno).

En otro sentido, cabe señalar que globalmente, los efectos tóxicos de metales pesados sobre rotíferos dulceacuícolas no han sido investigados a fondo y México no es la excepción; por lo que es muy importante seguir realizando investigaciones ecotoxicológicas con especies de diferentes nichos para poder mejorar las normas ambientales y mantener la estructura de los ecosistemas.

## X. CONCLUSIONES

Las variables poblacionales evaluadas (densidad máxima de población y la tasa diaria de incremento poblacional) se vieron afectadas por los metales pesados a concentraciones tan bajas como 0.625 µg/L para Cu y 0.0844 µg/L para Hg; disminuyendo al aumentar las concentraciones de los metales en el medio.

La densidad máxima poblacional y la  $r$  (tasa diaria de incremento poblacional), son variables sensibles a los metales pesados y por tanto resultan útiles para evaluaciones ecotoxicológicas.

El rotífero *Lecane quadridentata* resultó más afectado debido al efecto tóxico del mercurio que al del cobre; además de ser más sensible a la toxicidad de estos metales que otras especies del zooplancton.

Los límites máximos permisibles en agua para la protección de la vida acuática (NOM-001-SEMARNAT-1996), tanto de cobre como de mercurio, se encuentran por encima de las concentraciones subletales que *L. quadridentata* puede tolerar sin sufrir efectos negativos.

Es importante seguir realizando estudios ecotoxicológicos con especies de rotíferos pertenecientes a diferentes comunidades y nichos ecológicos.

## XI. LITERATURA CITADA

Alver M.O y Hagiwara A. 2007. An individual-based population model for the prediction of rotifer population dynamics and resting egg production. *Hydrobiologia* 593: 19-26.

APHA. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20<sup>a</sup> Edn. Washington, DC.

ASTM. 2004. Standard guide for acute toxicity test with the rotifer *Brachionus*. Annual Book de ASTM Standars. Vol. 11.06 E 1440-91. *American Society of Testing and Materials International*. West Conshohocken, PA. <http://www.astm.org>

Borowitzka M.A. y Borowitzka L.J. 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, United Kingdom.

Calabrese E.J. y Baldwin L.A. 2003. Inorganics and hormesis. *Critical Reviews in Toxicology*. 33: 215-304.

Case T.J. 2000. *An Illustrated Guide to Theoretical Ecology*. Oxford University Press, New York.

Casé M; Eskinazi L. E; Neumann L. S; Eskinazi S. E; Schwamborn R. y Travassos de Moraes J. A. 2008. Plankton community as an indicator of water quality in tropical shrimp culture ponds. *Marine Pollution Bulletin* (56):1343-1352.

Cervantes C. y Moreno-Sánchez R. (Eds.). 1999. *Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos*. A. G. T. Editor, S. A. México, D. F.

Conde-Porcuna J. M., Ramos-Rodríguez E. y Morales-Baquero R. 2004. El zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lénticos. *Ecosistemas*. 18 (002).

Chapman P.M., Wang F.Y., Janssen C.R., Gouletm R.R. y Kamunde C.N. 2003. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: Current status. *Human and Ecological Risk Assessment*. 9: 641-697.

De Jesús H.C., Costa E.A., Ferreira M.A.S. y Zandonade E. 2004. Distribution and abundance of heavy metals in sediments from Vitória Island estuarine system. *Química Nova* 27 (3): 378-386.



DOF. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que Establece los Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en las Descargas de Aguas Residuales en Aguas y Bienes Nacionales. *Diario Oficial de la Federación*. <http://www.semarnat.gob.mx>

Elias-Gutierrez M. y Sarma S.S.S. 1998. *Invertebrados Acuáticos: Rotífera*. En: *Enciclopedia de Quintana Roo*. Tomo 7: 327-343.

Enriquez-García C.E., Nandini S. y Sarma S.S.S. 2003. Food type effects on the population growth patterns of littoral rotifers and cladocerans. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31(2): 120-133.

Flores-Burgos J, Sarma S.S.S. y Nandini S. 2003. Population growth of zooplankton (rotifers and cladocerans) fed *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* in different proportions. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31(3): 240-248.

Flores-Burgos J, Sarma S.S.S y Nandini S. 2005. Effect of single species or mixed algal (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*) diets on the life table demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Acta Hydrochimica and Hydrobiologica.* 33(6): 641-621.

Forró L., Korovchinsky N.M., Kotov A.A. y Petrusek A. 2008. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia.* 595: 177-184.

Fraile A., Penche S., González F., Blázquez M.L., Muñoz J. A. y Ballester A.. 2005. Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*. *Chemistry and Ecology.* 21 (1): 61–75.

Gama-Flores J.L., Sarma S.S.S. y Nandini S. 2004. Acute and chronic toxicity of the pesticide methyl parathion to the rotifer *Brachionus angularis* (Rotifera) at different algal (*Chlorella vulgaris*) food densities. *Aquatic Ecology* 38: 27-36.

Gama-Flores J.L., Sarma S.S.S. y Nandini S. 2005. Interaction among copper toxicity, temperature and salinity on the population dynamics of *Brachionus rotundiformis* (Rotifera). *Hydrobiologia* 546: 559-568.

Gama-Flores J.L., Castellanos-Páez M.E., Sarma S.S.S. y Nandini S. 2007. Effect of pulsed exposure to heavy metals (copper and cadmium) on some population variables of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotífera: Brachionidae: Monogononta). *Hydrobiologia.* 593: 201-208.

Gama-Flores J. L., Castellanos-Páez M.E., Sarma S.S.S. y Nandini S. 2007. Life table demography of *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) exposed to copper at different levels and periods. *Journal of Environmental Biology*. 28(3):691-696.

Gama-Flores J.L.; Sarma S.S.S. y Nandini, S. 2009. Combined effects of exposure time and copper toxicity on the demography of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). *Journal of Environmental Science and Health A*. 44 (1): 86-93.

Hare L, Tessier A. y Borgmann U. 2003. Metal sources for freshwater invertebrates: Pertinence for risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*. 9(4): 779-793.

Harrison B.J. y Lewis A.G. 1998. *Copper Information Sourcebook*. International Copper Association, New York.

Hernández-Flores S. y Rico-Martínez R. 2006. Study of the Effects of Pb and Hg Toxicity using a chronic toxicity reproductive 5-Day test with the Freshwater Rotifer *Lecane quadridentata*. *Environmental Toxicology*. 21 (5): 533-540.

INE. 2008. Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional. Investigación sobre Sustancias Químicas y Riesgos Ecotoxicológicos. *Instituto Nacional de Ecología*. México D.F. <http://www.ine.gob.mx>.

Kammenga J. y Laskowski R. 2000. *Demography in Ecotoxicology*. John Wiley. England.

Koste W. 1978. *Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Ein Bestimmungswerk begründet von Max Voigt*. Bornträger, Stuttgart.

Langston W.J. y Bebianno, M.J. (Eds.). 1998. Metal metabolism in Aquatic Environments. *Ecotoxicology Series 7*. Springer, New York.

Luna-Andrade A, Aguilar-Durán R, Nandini S.y Sarma S.S.S. 2002. Combined effects of copper and microalgal (*Tetraselmis suecica*) concentrations on the population growth of *Brachionus plicatilis* Müller (Rotifera). *Water, Air, and Soil Pollution* 141: 143-153.

Margalef R. 1983. *Limnología*. Ediciones Omega. Barcelona, España.

Mendoza-Cantú A., Ramírez-Romero P. y Pica-Granados Y. 2007. Environmental legislation and aquatic ecotoxicology in Mexico: Past, present and future scenarios. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 42: 1343-1348.

Moalla S.M.N., Awadallah R.M., Rashed M.N. y Soltan M.E. 1998. Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser. *Hydrobiologia* 364: 31-40.

Morton-Bermea O., Hernández-Álvarez E., González-Hernández G., Romero F., Lozano R. y Beramendi-Orosco L.E. 2008. Assessment of heavy metal pollution in urban topsoils from the metropolitan area of Mexico City. *Journal of Geochemical Exploration*. 002: 1-7.

Nandini S. y Sarma S.S.S. 2001. Population growth of *Lepadella patella* (O. F. Müller, 1786) at different algal (*Chlorella vulgaris*) densities and in association with *Philodina roseola* Ehrenberg, 1832. *Hydrobiologia*. 446/447: 63-69.

Nandini S., Picazo-Paez E.A. y Sarma S.S.S. 2007. The combined effects of heavy metals (copper and zinc), temperatura and food (*Chlorella vulgaris*) level on the demographic characters of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 42(10): 1433-1442.

Newman M.C. y Clements W.H. 2007. *Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Pérez-Legaspi I.A.; Rico-Martínez R. 1998. Effect of temperature and food concentration in two species of littoral rotifers. *Hydrobiologia*. 387/388: 341-348.

Pérez-Legaspi I.A y Rico-Martínez R. 2001. Acute toxicity test on three species of the genus *Lecane* (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia*. 446/447: 375-381.

Pérez-Legaspi I.A, Rico-Martínez R. y Pineda-Rosas A. 2002. Toxicity testing using esterase inhibition as a biomarker in three species of the genus *Lecane* (Rotifera). *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 21 (4): 776-782.

Pérez-Legaspi I.A. y Rico-Martínez R. 2003. Phospholipase A2 activity in three species of littoral freshwater rotifers exposed to several toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 22 (10): 2349-2353.

Quintana Cabrales M.M., Hernández Nazario L., Morris Quevedo H. y Fernández González M. 1999. Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella sp.* *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 13(1): 9-13.

Ramírez-Pérez T. 2005. Toxicidad y efecto comparativo del cromo y cadmio sobre el crecimiento poblacional y la tabla de vida de *Brachionus calyciflorus* (Pallas) y *Brachionus patulus* (Müller) (ROTIFERA). Tesis de Maestría en Ciencias. *Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. México, D. F.

Ramírez-Pérez T., Sarma S.S.S. y Nandini S. 2004. Effects of mercury on the life table demography of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera). *Ecotoxicology* 13: 535-544.

Ramírez-Pérez T. y Sarma S.S.S. 2008. Combined effects of heavy metal (Hg) concentration and algal (*Chlorella vulgaris*) food density on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Brachionidae). *Journal of Environmental Biology*. 29 (2): 139-142.

Rodríguez-Zavala J.S., García-García J.D., Ortiz-Cruz M.A. y Moreno-Sánchez R. 2007. Molecular mechanism of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *J. Environmental Science and Health Part A*. 42(10): 1365-1378.

Rörig L.R., Tundisi J.G., Schettini C.A.F., Pereira-Filho J., Menezes J.T., Almeida T.C.M., Urban S.R., Radetski C.M., Sperb R.C., Stramosk C.A., Macedo R.S., Castro-Silva M.A. y Perez J.A.A. 2007. From a water resource to a point pollution source: the daily journey of a coastal urban stream. *Brazilian Journal of Biology*. 67(4): 597-609.

Salomons W., Förstner, U. y Mader, P. (Eds). 1995. *Heavy Metals. Problems and solutions*. Springer-Verlag, Berlin.

Sarma S.S.S.; Rao, T.R. 1991. The combined effects of food and temperature on the life history parameters of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera). *Int. Revue ges. Hydrobiologia*. 76: 225-239.

Sarma S.S.S. 1999. Checklist of rotifers (Rotifera) from Mexico. *Environment & Ecology*. 17(4): 978-983.

Sarma S.S.S. 2000. *The use of rotifers for ecotoxicological studies in Mexico*. En: *Estudios sobre plancton en México y el Caribe*. E. Ríos-Jara, Juárez-Carrillo, M. Pérez-Peña, E. López-Urriarte, E.G. Robles-Jarero, D.U. Hernández-Becerril y M. Silva-Briano (Eds.). *Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara*.

Sarma S.S.S., Ramírez-Pérez T. y Nandini S. 2000. Comparison of the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera) to selected heavy metals under

low and high food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 64(5): 735-739.

Sarma S.S.S., Nandini S. y Ramírez-Pérez T. 2001. Combined effects of mercury and algal food density on the population dynamics of *Brachionus patulus* (Rotifera). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 67: 841-847.

Sarma S.S.S., R.D. Gulati y Nandini S. 2005. Factors affecting egg-ratio in planktonic rotifers. *Hydrobiologia* 546: 361-373.

Sarma S.S.S.; Nandini, S.; Gulati, R.D. 2005. Life history strategies of cladocerans: comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia*. 542: 315-333.

Sarma S.S.S., Núñez-Cruz H.F. y Nandini S. 2005. Effects on the population dynamics of *Brachionus rubens* (Rotifera) caused by mercury and cadmium administered through medium and algal food *Chlorella vulgaris*. *Acta Zoologica Sinica*. 51(1): 46-52.

Sarma S.S.S, María-Isabel R. A. y Nandini S. 2006. Population dynamics of littoral rotifers (*Lecane inermis* y *Lepadella romboides*) in relation to algal (*Chlorella vulgaris*) food density. *International Journal of Ecology and Environmental Sciences*. 32 (3): 271-276.

Sarma S.S.S. y Nandini S. 2006. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 41: 1417-1430.

Sarma S.S.S., Espinosa-Rodríguez C.A. y Nandini S. 2007. Population growth responses of three *Brachionus* species (Rotifera: Brachionidae) fed live and dead (frozen or heat-killed) alga (*Chlorella vulgaris*). *International Journal of Ecology and Environmental Sciences*. 33 (1): 83-88.

Sarma S.S.S., Brena-Bustamante P.; Nandini S. 2008. Body size and population growth of *Brachionus patulus* (Rotifera) in relation to heavy metal (copper and mercury) concentrations. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 43: 547-553.

Segers H. Rotifera. 1995. *The Lecanidae (Monogononta). Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. SPB Academic Publishers, The Hague. Vol. 2.

Snell T.W. y Moffat B.D. 1992. A two-day life-cycle test with *Brachionus calyciflorus*. *Environmental Toxicology Chemistry*. 11: 1249-1257.

Snell T.W. y Janssen C.R. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* 313 (314): 231-247.

Snell T.W. y Joaquim-Justo C. 2007. Workshop on rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia*. 593: 227-232.

Vega Quintero S.M.S. 1996. Caracterización y análisis bromatológico de una cepa monoalgal: *Chlorella vulgaris* Beijerinck colectada en la atmósfera con posible uso en acuicultura. Tesis Licenciatura. *Universidad Nacional Autónoma de México*, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México, D. F.

Wallace R.L. y Snell T.W. 1991. *Rotifera. Ecology and Systematics of North American Freshwater Invertebrates*. New York, Academic Press.

Weber C.I. 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4a Ed. *United States Environmental Protection Agency*, Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90/027F.

Williamson C.E. y Reid J.W. 2001. *Copepoda*. En: *Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates*. Thorp J.H.; Covich A. (Eds.). 2a Ed. Academic Press, San Diego.

## XII. ANEXO

Medio de cultivo Basal de Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

1. Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ )	250 g/l
2. Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	75 g/l
3. Fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	75 g/l
4. Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	75 g/l
5. Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	25 g/l
6. EDTA	50 g + 31 g KOH/l
7. Sulfato de fierro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	4.89 g + 1 ml $\text{H}_2\text{SO}_4$
8. Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	11.42 g/l
9. Elementos traza:	
• Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.44 g/l
• Trióxido de molibdeno ( $\text{MoO}_3$ )	0.71 g/l
• Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ )	1.75 g/l
• Nitrato de cobalto ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ )	0.49 g/l
• Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ )	8.82 g/l

(Para 1 L de agua destilada, donde se agregan 1.5 ml de cada solución. Las soluciones se agregan en orden ascendente. La solución resultante tiene un color azul claro, lo que indica que la mezcla fue hecha correctamente).